



Rapport de mission à Montpellier France

**Accueil et encadrement du chercheur Abelmon Gesteira
(bourse DESI) dans le cadre de l'étude de l'interaction
cacao-*Crinipellis***

20 juin au 31 juillet 2004

**Fabienne Micheli
Cirad-Cultures Pérennes
Programme Cacao
UESC, Ilhéus-BA, Brésil**

CP N° 1745

Résumé

Cette mission avait deux objectifs principaux :

- l'accueil et l'encadrement au sein du département AMIS/Biotrop du chercheur Abelmon Gesteira (Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, Ilhéus-BA, Brésil) ayant obtenu une bourse DESI de 6 semaines;
- développement d'expériences de biologie moléculaire (macroarrays et criblage de banque BAC) portant sur l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis perniciosa*.

Les objectifs fixés pour cette mission ont été atteints. La mission a permis la bonne intégration de A. Gesteira au sein du laboratoire Biotrop ainsi que sa formation à des techniques de biologie moléculaire telles que l'obtention de macroarrays, l'utilisation de sondes radioactives et le criblage de banques BAC. Les expériences menées conjointement avec A. Gesteira ont permis d'obtenir des résultats significatifs pour l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis* telle qu'elle est actuellement entreprise dans la cadre de la collaboration entre le Cirad et l'UESC.

Agenda de la mission

Dimanche 20 juin 2004 :
Ilhéus-São Paulo-Paris

Lundi 21 juin 2004 :
Paris-Montpellier : arrivée à Montpellier à 12h40.
Installation dans les locaux du Cirad (Lavalette), présentation de Abelmon Gesteira aux chercheurs du programme Biotrop.

Mardi 22 juin 2004 :
Démarches administratives liées à l'obtention de la bourse DESI (Locaux Egide, Montpellier, centre ville).

Mercredi 23 juin 2004 – Vendredi 30 juillet 2004 :
Laboratoire Biotrop : expériences de biologie moléculaire/interaction cacao-*Crinipellis*.

Samedi 31 juin 2004 :
Départ de Montpellier.

1. Contexte

1.1. Objectifs de la mission :

Cette mission avait deux objectifs principaux :

- l'accueil et l'encadrement au sein du département AMIS/Biotrop du chercheur Abelmon Gesteira (Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, Ilhéus-BA, Brésil) ayant obtenu une bourse DESI de 6 semaines (origine de la proposition : F. Micheli);
- le développement d'expériences de biologie moléculaire (macroarrays et criblage de banque BAC) portant sur l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis pernicioso*.

Deux objectifs secondaires ont également pu être assignés à cette mission :

- faire le point sur les résultats obtenus par Laurence Alemanno et Christine Sanier (programme cacao) dans le cadre de l'étude histologique de l'interaction cacao-*Crinipellis* ;
- mettre en place, avec Dominique Garcia et Valérie Pujade-Renaud (programme hévéa), les expériences de biologie moléculaire liées à l'étude de l'interaction hévéa-*Microcyclus*, et ce en prévision de l'affectation de Dominique Garcia à l'UESC en novembre 2004.

1.2. Déroulement :

Pour l'organisation de cette mission et l'appui logistique sur place, j'adresse mes remerciements à Xavier Sabau (Cirad-AMIS/Biotrop) et à Didier Clément (Cirad-CP/programme cacao).

Cette mission scientifique et partenariale a bénéficié de l'appui financier du Ministère Français des Affaires Etrangères, via la délégation Cirad/Inra à Brasilia. J'adresse mes remerciements au MAE et au Directeur Régional du Cirad, Etienne Hainzelin, pour cet appui.

2. Accueil et l'encadrement au sein du département AMIS/Biotrop du chercheur Abelmon Gesteira

Un accord de collaboration entre le Cirad (CP/programme cacao) et l'Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) à Ilhéus (Bahia, Brésil) a été signé en juillet 2002 pour une période de 3 ans. Cet accord, qui prévoit la mise à disposition de l'UESC d'un chercheur du Cirad spécialisé en génomique, a permis mon affectation au Brésil en octobre 2002 pour travailler au sein du laboratoire de Génétique de l'UESC (Coordinateur : Júlio Cascardo).

Afin de contribuer à l'avancement des travaux en cours et de renforcer le partenariat Cirad-UESC, il a été proposé de faire venir à Montpellier un chercheur de l'UESC dans le cadre d'une bourse DESI. La période de stage a été choisie de façon à coïncider avec ma présence à Montpellier (avant période de congés annuels). Le chercheur ayant obtenu la bourse DESI, Abelmon Gesteira, est Docteur en Génétique et Amélioration végétale de l'Université de Viçosa (Minas Gerais, Brésil) et travaille depuis mai 2002 au sein du laboratoire de Génétique de l'UESC. Il a notamment été à l'origine de la mise au point d'un nouveau protocole d'extraction d'ARN de cacao (Gesteira *et al.*, 2003) et de l'obtention de bibliothèques de cDNA d'interaction cacao-*Crinipellis*. Au cours de ce stage, Abelmon Gesteira a fait preuve de très bonnes qualités d'adaptation et a participé activement aux expériences de confection et d'hybridation de macroarrays, et de criblage de banque BAC.

3. Expériences de biologie moléculaire portant sur l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis perniciosa*

3.1. Confection et hybridation de macroarrays (avec l'appui de Xavier Sabau)

Partant d'environ 1000 produits PCR obtenus au laboratoire de Génétique de l'UESC, et provenant de l'amplification de cDNA de bibliothèques d'interaction cacao-*Crinipellis*, ont été confectionnés, à l'aide d'un dotter manuel (Multi-blot replicator, V&P Scientific, Inc., USA), 15 macroarrays identiques (produits PCR fixés sur membrane de Nylon).

Cinq sondes, correspondant à différents stades de l'interaction cacao-*Crinipellis* ont été obtenues par marquage radioactif à l'aide du kit MegaprimeTM DNA Labelling Systems dans les conditions décrites par le fournisseur (Amersham).

Après pré-hybridation (dans une solution de Tris-HCl/Denhardt/EDTA/SSC/SDS), les macroarrays sont hybridés sur la nuit avec les différentes sondes radioactives. Après lavages (solutions à base de SSC et SDS), les membranes sont exposées 3h et révélées par le Bio Imaging Analyzer BAS-5000 (Fujifilm).

L'analyse des hybridations est ensuite effectuée dans Excel à partir d'un programme développé par X. Sabau. Les résultats obtenus sont en cours d'analyse.

3.2. Criblage de banque BAC (avec l'appui de Xavier Sabau et de Didier Clément)

Vingt-sept produits PCR, correspondant à 27 gènes d'intérêt de l'interaction cacao-*Crinipellis*, sont utilisés comme sondes (voir méthode de marquage §3.1) pour cribler la bibliothèque BAC de cacao (Clément *et al.*, 2004). Tout d'abord, trois sondes comprenant chacune 9 gènes (pool 1-3) sont utilisées pour cribler la banque. Les clones s'hybridant avec les pools de gènes sont récupérés à partir de la banque « mère » stockée à -80°C et sont spottés sur membrane de Nylon (9 membranes) comme décrit dans le § 3.1. Les nouvelles membranes sont ensuite hybridées avec les mêmes 27 gènes organisés en pool de 3, de façon à pouvoir repérer, par identification croisée, le clone BAC correspondant à chacun des gènes. Finalement, 21 clones BAC ont pu définitivement être identifiés comme s'hybridant avec les gènes d'intérêt.

En parallèle, l'ADN plasmidique des clones bactériens de la banque BAC identifiés avec le premier jeu de sondes (pool 1-3) est isolé comme décrit par Clément *et al.* (2004) à l'aide du Qiagen Bio Robot 9600 (Qiagen, Allemagne).

4. Autres contacts établis durant cette mission

4.1. Etude histologique de l'interaction cacao-*Crinipellis*

Cette étude, développée en collaboration avec Laurence Alemanno, consiste en l'analyse histologique de l'interaction cacao-*Crinipellis*. Le matériel végétal fixé, inclus, coupé puis coloré (voir rapport d'activités de F. Micheli 2003) a finalement été analysé en microscopie optique par Christine Sanier. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence la progression du champignon dans les tissus de cacao infectés et d'émettre des hypothèses quant au mode de pénétration et de propagation du champignon lors de l'infection. Ces analyses pourront dans un premier temps, être intégrées à une publication portant sur une étude histologique de l'interaction cacao-*Crinipellis* effectuée par Geruza Ceita, étudiante de l'UESC venant de soutenir son DEA (Co-directeur du DEA : F. Micheli). D'autre part, de façon à vérifier les hypothèses émises à partir de ces premières analyses, il est envisagé d'effectuer des expériences complémentaires en collaboration avec Karina Gramacho, phytopathologiste du Cepec (Ilhéus-BA, Brésil).

4.2. Etude moléculaire de l'interaction hévéa-*Microcyclus*

Depuis 2002, ont été évaluées les possibilités d'une collaboration entre le CIRAD-CP Programme Hévéa (et plus particulièrement Dominique Garcia à l'époque en poste à Rondonopolis sur la Plantation Michelin Mato Grosso-PMG), l'UESC et Michelin (Plantation Michelin da Bahia-PMB) pour l'étude de l'interaction hévéa-*Microcyclus ulei* par génomique fonctionnelle. Dans ce contexte, plusieurs réunions ont eu lieu entre les différents protagonistes : i) en mai 2003, à l'UESC; ii) en décembre 2003, à PMB; iii) en mai 2004, lors de l'International Workshop on South American Leaf Blight qui s'est déroulé à Itaparica-BA. Suite à ces rencontres, et suite à l'obtention par D. Garcia (sous la coordination de J. Cascardo) d'une bourse de « Visiting scientist » par la FAPESB, il a été décidé que D. Garcia serait affecté à l'UESC en novembre 2004, pour développer le projet « ESTs hévéa-*Microcyclus* ». Le matériel végétal nécessaire à cette étude sera cultivé et inoculé, en collaboration avec Carlos Mattos (phytopathologiste), à PMB où Dominique passera 30% de son temps (les 70% restant étant consacrés au travail de biologie moléculaire à l'UESC). Le laboratoire de Génétique de l'UESC fournira les locaux, l'équipement ainsi que les moyens humains (chercheurs et étudiants) pour le développement du projet. Le financement des recherches (consommables) sera en partie assumé par des fonds Michelin.

Dans le but de cette nouvelle affectation, ont été définis avec D. Garcia et Valérie Pujade-Renaud les pré-requis (formation, matériel végétal, techniques, consommables...) nécessaires à une planification efficace et coordonnée des expériences de biologie moléculaire qui seront développées à la fois à l'UESC et à Montpellier à partir de novembre 2004.

5. Conclusion

Il apparaît que les objectifs fixés pour cette mission ont été atteints. La mission a permis la bonne intégration d'Abelmon Gesteira au sein du laboratoire Biotrop ainsi que sa formation à des techniques de biologie moléculaire telles que l'obtention de macroarrays, l'utilisation de sondes radioactives et le criblage de banques BAC. Les expériences menées conjointement avec A. Gesteira ont permis d'obtenir des résultats significatifs pour l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis* telle qu'elle est actuellement entreprise dans la cadre de la collaboration entre le Cirad et l'UESC. D'une façon générale, ce stage a permis de mieux mettre en relation les recherches conduites au Brésil dans la cadre du partenariat UESC-CIRAD avec le dispositif de recherche sur le cacao du Cirad (CP/Cacao et AMIS/Biotrop) à Montpellier.

D'autre part, les contact pris sur d'autres sujets tels que l'étude histologique de l'interaction cacao-*Crinipellis* et l'étude moléculaire de l'interaction hévéa-*Microcyclus* permettent d'envisager à court et moyen termes des résultats prometteurs ainsi qu'un renforcement de nos collaborations avec les différentes institutions publiques (UESC, Cepec) et privées (Michelin) impliquées.